

# Kinetische Bestimmung der alkalischen Serum-Phosphatase

Von K. LAUBER und R. RICHTERICH

Aus dem Medizinisch-Chemischen Institut der Universität Bern (Direktor: Prof. Dr. med. H. Aebi)  
und dem Chemischen Zentrallaboratorium des Inselspitals Bern (Direktor: PD Dr. med. R. Richterich)

(Eingegangen am 11. Dezember 1965)

Eine Methode zur „kinetischen“ Bestimmung der alkalischen Phosphatase wird beschrieben und diskutiert. Das Substrat p-Nitrophenylphosphat wird in der Photometerküvette inkubiert. Die durch das freigesetzte p-Nitrophenol bewirkte zeitliche Extinktionszunahme wird registriert. Aus der Steilheit der aufgezeichneten Geraden wird die Enzymaktivität berechnet. Zeitaufwand für eine Serumanalyse: 1–2 Min.; Serumbedarf: 20  $\mu$ l. Das Verfahren wird mit der klassischen „Zweipunktmethode“ verglichen.

A method for the „kinetic“ determination of alkaline phosphatase is described and discussed. The substrate, p-nitrophenylphosphate, is incubated in the photometer cuvette. The increase in extinction due to the release of p-nitrophenol is recorded against time. Enzyme activity is calculated from the slope of the resulting plot. Time required for one serum analysis: 1–2 min.; serum required: 20  $\mu$ l. The method is compared with the classical „two point“ method.

Für die Bestimmung von Enzymaktivitäten im klinischen Labor stehen uns ganz allgemein zwei grundsätzlich verschiedene Verfahren zur Verfügung: die „Zweipunkt“-Methode und die „kinetische“ Methode.

Bei der *Zweipunktmethode* wird in zwei gleichen Enzym-Substrat-Gemischen die Reaktion nach zwei verschiedenen Inkubationszeiten ( $t_0$  und  $t$ ) unterbrochen (massive pH-Änderung oder Inhibitorzusatz). Mittels einer Farbreaktion wird dann in beiden Ansätzen das umgesetzte Substrat ermittelt. Aus der Zeitdifferenz ( $t-t_0$ ) und dem Unterschied der Substratkonzentration in den beiden Proben läßt sich die Enzymaktivität berechnen. — Bei der *kinetischen Analyse* wird die Enzymreaktion im Photometer entweder vom Auge oder mittels Registriergerät laufend verfolgt. Der Differentialquotient  $\frac{dE}{dt}$ ,

d. h. die durch Substratumsatz pro Zeiteinheit bewirkte Extinktionsänderung ist in jedem Augenblick der Enzymaktivität direkt proportional. Kinetische Enzymbestimmungen lassen sich im Routinelabor naturgemäß nur durchführen, wenn durch das untersuchte Enzym — oder ein damit gekoppeltes Hilffsystem — eine im sichtbaren oder nahen UV-Bereich stark absorbierende Substanz gebildet oder verbraucht wird. Ist diese Bedingung erfüllt, dann sollte der kinetischen Methode in jedem Fall der Vorzug gegeben werden — auch dann, wenn kein Registriergerät zur Verfügung steht. Die kinetische Analyse ist schneller, erfordert nur eine Probe (keine Leerwertbestimmung) und kommt ohne Reagenzgläser aus (keine Kontaminationsgefahr infolge schlecht gewaschenen Geschirrs). Für jede einzelne Analyse kann außerdem direkt kontrolliert werden, ob das Gesetz der Reaktion nullter Ordnung ( $\frac{dE}{dt} = \text{konstant}$ ) streng gültig ist oder ob sich die Enzymaktivität aus irgendeinem Grund während der Inkubation verändert. Die Zweipunktmethode arbeitet in dieser Hinsicht „blind“, da sich durch zwei Punkte ja immer eine Gerade legen läßt.

Die *alkalische Serumphosphatase* wird heute noch vorzugsweise nach der Zweipunktmethode bestimmt, obschon sie sich ausgezeichnet für die kinetische Bestimmung

eignet. Aus dem farblosen p-Nitrophenylphosphat setzt die alkalische Phosphatase das oberhalb pH 9 intensiv gelb gefärbte p-Nitrophenol frei. FRAJOLA und Mitarbeitern (1) kommt das Verdienst zu, erstmals eine Methode für den kinetischen Phosphatasetest vorgeschlagen zu haben. Entgegen dem allgemeinen Bestreben, möglichst alle Enzymaktivitäten in Internationalen Einheiten (IU) auszudrücken, haben aber FRAJOLA und Mitarbeiter zu der verwirrenden Fülle von schon bestehenden noch eine neue „private“ Einheit hinzugefügt; Ihr Verfahren ist zudem unnötig umständlich und arbeitet nicht unter optimalen Inkubationsbedingungen. In der vorliegenden Arbeit wird eine verbesserte Methode beschrieben und diskutiert, die eine Bestimmung in weniger als zwei Minuten erlaubt.

## Methodik

### Reagenzien

p-Nitrophenylphosphat, Dinatriumsalz  
Pufferlösung pH 10,3: 5 g 2-Amino-2-methyl-1,3-propandiol („Ammediol“), 2,5 g Natriumcarbonat sicc., 1 g Natriumhydrogencarbonat und 0,15 g Magnesiumsulfat ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ), werden mit  $\text{H}_2\text{O}$  ad 1 l gelöst.

Substrat/Puffer-Lösung: 10 mg p-Nitrophenylphosphat in 10 ml Puffer auflösen (unmittelbar vor Gebrauch herstellen).

### Geräte

#### unerlässlich

Photometer mit Monochromator (die hier beschriebenen Versuche wurden mit dem „Eppendorf“-Gerät durchgeführt)

Küvetten mit 1 cm Schichtdicke, vorzugsweise in Halbmikro-Ausführung (4 mm lichte Breite)

Wasserbad, auf 25° thermostatisiert.

#### empfehlenswert

heizbarer Küvettenhalter

Registrierapparat zum Photometer mit linearisierter Extinktionskala (z. B. „W + W“-Gerät).

### Arbeitsvorschrift

In einem auf 25° thermostatisierten Wasserbad wird das Puffer/Substratgemisch vorgewärmt. In der geheizten Photometerküvette werden 0,5 ml Puffer/Substrat mit 20  $\mu$ l Serum durch Umrühren mit einem Plastikstäbchen gut gemischt. (Bei Verwendung von quadratischen Makroküvetten: 2,5 ml Puffer/Substrat + 0,1 ml

Serum). Bei 405m $\mu$ (Hg-Linie) wird photometriert. Mit Hilfe des Verstärkers wird die Extinktion in die Nähe von 0 gebracht und dann während 1–2 Min. registriert — entweder mit dem automatischen Schreiber oder durch drei- bis viermaliges Ablesen in Abständen von genau 30 Sek. Während die eine Probe „läuft“, wird in einer zweiten Küvette die nächste vorbereitet. Steht kein heizbarer Küvettenhalter zur Verfügung, dann muß die Messung jeder Probe sofort nach dem Mischen beginnen, falls die Raumtemperatur wesentlich von 25° verschieden ist.

### Auswertung

Die internationalen Phosphatase-Einheiten werden nach folgender Formel berechnet:

$$IU = \frac{\Delta E \cdot \text{Min.}}{\varepsilon \cdot d} \cdot \frac{EV}{AV} \cdot 10^6 \quad (= \mu\text{Mol gespaltenes Substrat pro Min. und l Serum}).$$

$\Delta E/\text{Min.}$ : Extinktionszunahme pro Min.;

$\varepsilon$ : Extinktion einer 1M Nitrophenylphosphatlösung (molarer Extinktionskoeffizient)

$d$ : Schichtdicke der Meßküvette

EV bzw. AV: Volumen der Meßlösung (Endvol.) bzw. des Serums (Anfangsvol.)

Bei Einhaltung der oben angegebenen Arbeitsbedingungen ergibt sich:

$$IU = \frac{\Delta E \cdot \text{Min.} \cdot 520}{18530 \cdot 20} \cdot 10^6 = \Delta E/\text{Min.} \cdot 1400 \quad (1)$$

$$= \Delta E/30 \text{ Sek.} \cdot 2800$$

Beim Arbeiten mit dem Eppendorf-Registriergerät („W + W“) mit einem Papiervorschub von 1 cm/Min. und vierfacher Extinktionsdehnung ( $E = 1,0$  entspricht 80 cm) berechnen sich die Einheiten nach folgender Formel:

$$IU = \text{tg } \alpha \cdot 17,5 \quad (2)$$

$\alpha$ : Winkel zwischen Papierkante und aufgezeichneter Geraden

Bei anderem Vorschub und anderer Extinktionsdehnung ist der Faktor in Formel 2 sinngemäß abzuändern. Jedes Rechnen kann umgangen werden, wenn ein auf die Methode zugeschnittenes „Enzymlineal“ zur Verfügung steht. Ein solches kann man sich ohne großen Aufwand selbst basteln. Die Abmessungen des Gerätes werden so eingestellt, daß die auf dem Maßstab abgelesenen Millimeter der Anzahl Enzymeinheiten entsprechen (Abb. 1). Beim Ablesen ohne Registriergerät wird aus drei oder vier aufeinanderfolgenden  $\Delta E/30$  Sek. das Mittel genommen und in Formel 1 eingesetzt.

Die Extinktionszunahme infolge von Spontanhydrolyse des Substrates (ohne Enzym) ist geringer als einer IU entsprechend.

### Diskussion

#### Extinktion des p-Nitrophenols bei 405 m $\mu$ als Funktion des pH

Eine etwa  $40 \cdot 10^{-6}$  M-Lösung von p-Nitrophenol in einem etwa 0,2M Gemisch von Tris und Glykokoll wurde bei verschiedenen pH-Werten bei 405 m $\mu$  photometriert. Dabei ergaben sich folgende Extinktionen (Tab. 1):

Tab. 1  
pH-Abhängigkeit der Extinktion von p-Nitrophenol

pH	E
8	0,586
8,5	0,619
9	0,634
9,5	0,632
10	0,633
10,5	0,634
11	0,633

In der Nähe des pH-Optimums der alkalischen Phosphatase (um 10) ist die Extinktion des p-Nitrophenols vom pH unabhängig.

#### pH-Optimum und Pufferwahl

Für die Hydrolyse des p-Nitrophenylphosphats durch die alkalische Serumphosphatase ist als pH-Optimum für verschiedene Puffer das Gebiet zwischen 10,2 und 10,5 gefunden worden. Es ist bekannt, daß die Puffersubstanz die Enzymaktivität erheblich beeinflussen kann (2). Bei pH 10 ist die Pufferauswahl ziemlich begrenzt. Der von FRAJOLA (1) vorgeschlagene Tris-Puffer ist nur unterhalb pH 9 brauchbar und kommt somit nicht in Frage. Für Zweipunktmessungen ist bisher oft 2-Amino-2-methyl-1,3-Propandiol („Ammediol“) als Puffer verwendet worden (3). Das  $pK_B$  von Ammediol liegt aber bei 5,3 (4). Seine Pufferkapazität ist daher bei pH 10 schlecht. Beim offenen Stehen von 0,1M Ammediollösung von pH 10 an der Luft kann dessen pH durch  $\text{CO}_2$ -Aufnahme innerhalb einer Stunde so weit absinken, daß die gemessenen Enzymaktivitäten wesentlich tiefer ausfallen als bei ganz frischem Puffer. Anhand von drei Seren von verschiedener Phosphataseaktivität wurden 5 Puffersysteme bei dem für die Esterspaltung optimalen pH untersucht. Alle Puffer enthielten 0,5 mMol Mg/l. Wie aus Tabelle 2 hervorgeht, ist die Enzymaktivität in Ammediol/Carbonat (pH 10,3) höher als in allen anderen Puffern. Ammediol hat nebenbei noch den Vorteil,

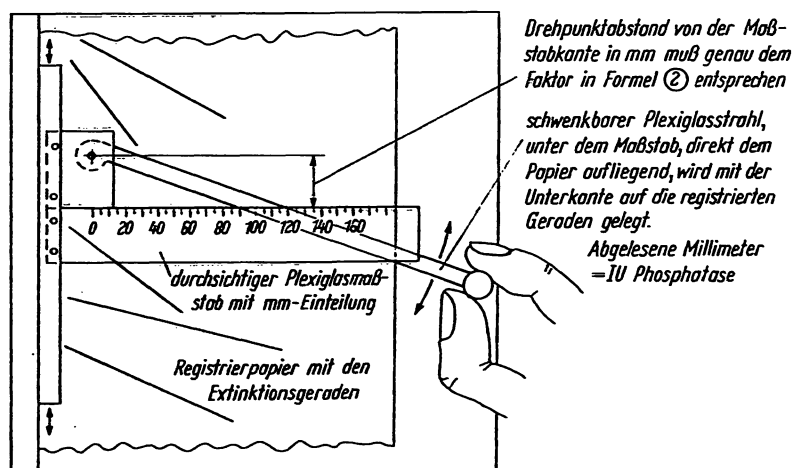


Abb. 1

„Enzymlineal“ für Direktablesung der Phosphataseaktivität in Internationalen Einheiten (IU)

Tab. 2  
Abhängigkeit der Phosphataseaktivität von der Art des Puffers

Puffer		pH	S <sub>1</sub>	IU S <sub>2</sub>	S <sub>3</sub>	relative Akt. (Mittel)
Na-Carbonat/Na-Hydrogencarbonat	0,05 M	10,2	13	26	100	74
Glykokoll/NaOH (5, 6, 7)	0,05 M	10,5	15	29	104	78
Piperazin/HCl	0,05 M	10,3	15½	32	114	87
Ammediol ohne Zusatz (3)	0,05 M	10,0	17	33	127	94
Ammediol + Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> /NaHCO <sub>3</sub>	0,05 M 0,035 M }	10,3	18	36	136	100

Tab. 3  
Substratkonzentrationen

LAURENT und NORBERG (7)	8,9 · 10 <sup>-3</sup> M
SOMMER (8)	7,3 · 10 <sup>-3</sup> M
BESSEY und LOWRY (5)	6,9 · 10 <sup>-3</sup> M
BERGMEYER (8)	4,3 · 10 <sup>-3</sup> M
RICHTERICH (3)	3,65 · 10 <sup>-3</sup> M
FRAJOLA (1)	0,33 · 10 <sup>-3</sup> M

daß es „bakterienfeindlicher“ und somit besser haltbar ist als das von anderen Autoren verwendete Glykokoll (5, 6, 7).

#### Einfluß des Magnesium-Zusatzes

Sechs verschiedene Seren wurden nach der oben vorgeschlagenen Methode mit und ohne Magnesiumzusatz untersucht. Das Magnesium bewirkte eine Aktivitätserhöhung von 6; 9; 11; 10; 6; 9% (Mittel 8,5%).

#### Substratsättigung

Die bisher verwendeten Substrat-Endkonzentrationen schwanken je nach Autor ganz erheblich, wie Tabelle 3 zeigt.

Anhand von 3 Seren mit niedriger, mittlerer und hoher Aktivität wurde die Substratsättigungskurve aufgenommen<sup>1)</sup> (Abb. 2 u. 3). Alle Messungen wurden nach der oben angegebenen Vorschrift ausgeführt. Mit Hilfe der Darstellung nach EADIE (Berechnung der Regressionsgeraden) wurde eine mittlere Michaelis-Konstante von 1,65 · 10 mM gefunden. Bei der Bestimmung von Enzymaktivitäten wird im allgemeinen nach der Regel Substratkonzentration  $\approx 10 K_m$  gearbeitet. Im vorliegenden Fall würde dies bedeuten, daß die Substratkonzentration im Inkubationsgemisch etwa 16 · 10 mM sein müßte. Keiner der angeführten Autoren verwendet so hohe Konzentrationen — wohl ganz einfach aus preislichen Gründen. Eine Überschußhemmung ist erst oberhalb 20 · 10 mM festzustellen. Wegen des hohen Preises des reinen Nitrophenylphosphates haben wir für die Routinebestimmungen im klinischen Labor, die von RICHTERICH (3) vorgeschlagene Konzentration von 3,65 · 10 mM (1 mg/ml) beibehalten. Die Sättigungskurve ist bei dieser Konzentration schon so flach, daß eine Abweichung von 10% in der Substratkonzentration nur einen Fehler von etwa 3% in der Aktivitätsmessung zur Folge hätte. Bei zu niedriger Substratkonzentration besteht die Gefahr, daß bei hoher Enzymaktivität die pro Zeiteinheit umgesetzte Substratmenge nicht mehr zur Enzymkonzentration proportional ist, d. h. daß sich in der Gleichung  $\frac{[S][E]}{[ES]} = K$  der Ausdruck [ES] der Größenordnung von [S] nähert.

Mit einem Serum von hoher Enzymkonzentration (253 IU) wurde mittels physiologischer Kochsalzlösung

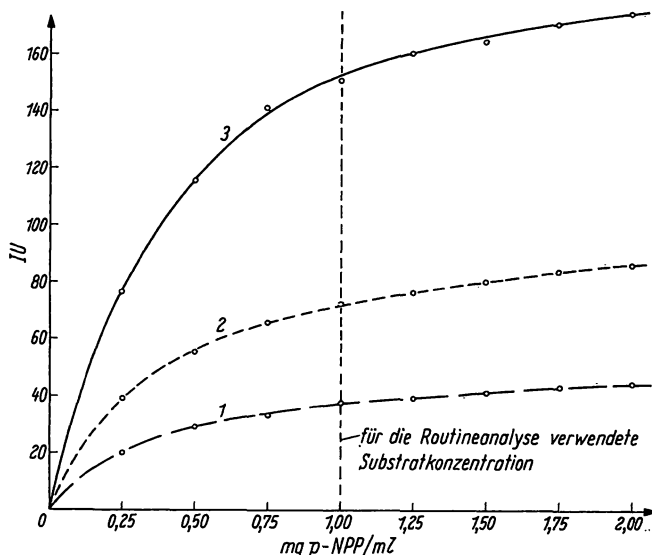


Abb. 2  
Substratsättigung bei drei verschiedenen Seren

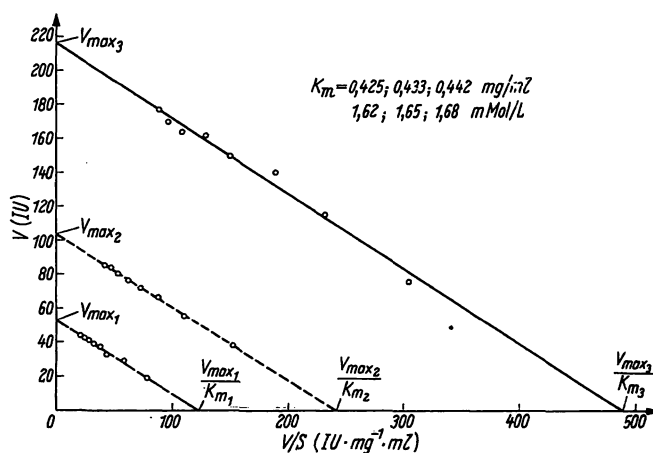


Abb. 3  
Auswertung der Sättigungskurven aus Abbildung 2 nach EADIE

<sup>1)</sup> p-Nitrophenylphosphat der Fa. Schweizerhall.

eine lineare Konzentrationsreihe hergestellt und durchgetestet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4 zusammengestellt.

Aus Tabelle 4 geht hervor, daß bis zu einer Aktivität von 250 IU (normal bis 33 IU) direkte Proportionalität zwischen Enzymkonzentration und gemessener Aktivität besteht. Ein allfälliges Abbiegen der Geraden bei noch höherer Enzymkonzentration ist klinisch belanglos.

Tab. 4

Proportionalität zwischen Enzymkonzentration und gemessener Aktivität

relative Konz.	gemessene Aktivität (IU)	theoretisch zu erwartende Aktivität
1	253	
4/5	198	202
3/5	151	152
2/5	103	101
1/5	51 1/2	50 1/2

#### Temperaturkoeffizient

Phosphatasebestimmungen werden im klinischen Labor schon verhältnismäßig lange durchgeführt. Deshalb wird heute noch meist bei der früher für Enzymbestimmungen üblichen Temperatur von 37° gearbeitet, während sich bei „modernerer“ Enzymen allgemein die Inkubationstemperatur von 25° durchgesetzt hat. Um die bei 25° und bei 37° bestimmten Aktivitäten vergleichen zu können, wurden 40 Blutspenderseren bei beiden Temperaturen untersucht. Der mittlere Quotient  $\frac{A_{37}}{A_{25}}$  berechnete sich zu  $1,59 \pm 0,07$ .

Tab. 5

Vergleich zwischen kinetischer und Zweipunktmethode

Zweipunktmethode 37° IU	kinetische Methode 25° IU (gef. Werte · 1,59)
34	34
34	33
67	69
78	79
54	54
29	29
30	29
22	23
46	46
99	103
20	21
40	38

An einem Serum wurde die Aktivitätsmessung bei 15°; 20°; 25°; 30° und 35° vorgenommen. Folgende Quotienten wurden gefunden: 35°/30°: 1,21; 30°/25°: 1,24; 25°/20°: 1,27; 20°/15°: 1,30.

Vergleich zwischen Zweipunktmethode (37°) und kinetischer Methode (25°) unter Verwendung des Temperaturkoeffizienten 1,59

Die hierbei gefundenen Zahlen sind in Tabelle 5 wieder gegeben.

#### Normalbereich

60 Blutspenderseren wurden nach der oben angegebenen Methode analysiert und statistisch ausgewertet (Abb. 4).

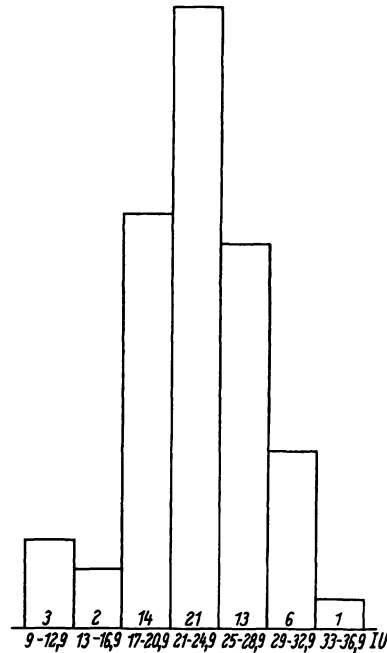


Abb. 4

Normalverteilung der alkalischen Phosphatase in 60 Blutspenderseren

Hierbei ergaben sich folgende Zahlen: Mittelwert  $\bar{X} = 23,3$  IU; Standardabweichung  $s = 5,05$ ; Normalbereich  $\bar{X} \pm 2s = 13,1-33,3$  IU. Umgerechnet auf die Inkubationstemperatur 37° wird der Normalbereich zu 21-53 IU (Temperaturkoeffizient 1,59). Für eine beliebige Substratkonzentration läßt sich der Normalbereich wie folgt berechnen:

$$\bar{X} \pm 2s = \frac{S}{S + 1,65} (19-48)$$

$S$  = Substratkonzentration in mMol/l; 1,65 =  $K_m$ ; 19-48 = theoretischer Normalbereich bei  $V_{max}$  (aus Abb. 3 errechnet).

#### Literatur

1. FRAJOLA, W. J., R. D. WILLIAMS und R. A. AUSTAD, Amer. J. Clin. Path. 43, 261 (1965). — 2. AEBI, H., Schw. med. Wschr. 82, 135 (1952). — 3. RICHTERICH, R. und E. GAUTIER, Schw. med. Wschr. 92, 1 (1962). — 4. GOMORI, G., Proc. Soc. exp. Biol. Med. 62, 33 (1946). — 5. BESSEY, O. A., O. H. LOWRY und M. J. BRÖCK,

J. biol. Chemistry 164, 321 (1946). — 6. SOMMER, A. J., Med. Bull, S. Louis Univ. 4, 165 (1952). — 7. LAURENT, B. und B. NORBERG, Scand. J. Clin. Laborat. Invest. 12, 154 (1960). — 8. BERGMAYER, H. U., Methoden der enzymatischen Analyse, S. 783, Verlag Chemie GmbH, Weinheim Bergstr. (1962).

Dr. chem. Konrad Lauber  
Med.-Chem. Institut der  
Universität Bern (Schweiz),  
Bühlstraße 28